



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio de genes relacionados con la longevidad en un modelo animal de
Esclerosis Lateral Amiotrófica

Study of genes related to longevity in an Amyotrophic Lateral Sclerosis animal
model

Autor/es

Marta Carreño Gútiéz

Director/es

Ana Cristina Calvo Royo
Laura Moreno Martínez

Facultad de Veterinaria

2019

ÍNDICE

Resumen	<i>pág. 2</i>
<i>Español</i>	<i>pág. 2</i>
<i>Inglés</i>	<i>pág. 2</i>
Introducción	<i>pág. 4</i>
<i>Modelo de ratones hSOD1-G93A</i>	<i>pág. 6</i>
<i>Características del modelo hSOD1-G93A</i>	<i>pág. 6</i>
<i>Identificación de los ratones</i>	<i>pág. 6</i>
<i>Desarrollo de la enfermedad en este modelo animal</i>	<i>pág. 7</i>
Justificación y objetivos	<i>pág. 7</i>
Metodología	<i>pág. 7</i>
<i>Genotipado de ratones hSOD1-G93A</i>	<i>pág. 7</i>
<i>Extracción de ADN genómico</i>	<i>pág. 7</i>
<i>PCR</i>	<i>pág. 8</i>
<i>Programación termociclador</i>	<i>pág. 10</i>
<i>Gel agarosa 2% en Tris-borato-EDTA 1x</i>	<i>pág. 11</i>
<i>Carga de las muestras de PCR en el gel de agarosa</i>	<i>pág. 12</i>
<i>Electroforesis</i>	<i>pág. 12</i>
<i>Elección de las muestras</i>	<i>pág. 12</i>
<i>Genes relacionados con la longevidad</i>	<i>pág. 13</i>
<i>Búsqueda de genes</i>	<i>pág. 13</i>
<i>Diseño de los primers</i>	<i>pág. 14</i>
<i>Puesta a punto de la PCR</i>	<i>pág. 14</i>
<i>Primera PCR</i>	<i>pág. 14</i>
<i>Segunda PCR</i>	<i>pág. 17</i>
<i>PCR final</i>	<i>pág. 18</i>
<i>Purificación de las muestras amplificadas</i>	<i>pág. 18</i>
Resultados y discusión	<i>pág. 19</i>
<i>Genotipado de los ratones hSOD1-G93A</i>	<i>pág. 20</i>
<i>Diseño de los primers</i>	<i>pág. 21</i>
<i>Puesta a punto de la PCR</i>	<i>pág. 22</i>
<i>Primera PCR</i>	<i>pág. 22</i>
<i>Segunda PCR</i>	<i>pág. 23</i>
<i>PCR final de las muestras a analizar</i>	<i>pág. 24</i>
<i>Análisis de la secuenciación</i>	<i>pág. 24</i>
Conclusiones	<i>pág. 27</i>
<i>Español</i>	<i>pág. 27</i>
<i>Inglés</i>	<i>pág. 28</i>
Valoración personal	<i>pág. 29</i>
Agradecimientos	<i>pág. 29</i>
Bibliografía	<i>pág. 31</i>
Anexo I	<i>pág. 34</i>

RESUMEN

ESPAÑOL

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad rara que cursa con una degeneración paulatina de las motoneuronas superiores e inferiores. Se ha estudiado la ELA familiar en esta investigación dado que el modelo de ratón utilizado hSOD1-G93A corresponde a este tipo. Los objetivos perseguidos eran estudiar diversas zonas de un gen o genes que se relacionaran con la longevidad en este modelo, tratando de averiguar si existen mutaciones en estos genes que puedan influir en la supervivencia de los animales. Tras el genotipado de los ratones y conociendo su longevidad, se seleccionó el gen FOXO3, cuya relación con la esperanza de vida de las personas parecía ser prometedor para hallar resultados similares en estos animales. Para ello, se llevó a cabo el diseño de los primers que se precisaban para poder realizar la amplificación mediante PCR de este gen en las muestras. Fue necesaria también una puesta a punto de la PCR para el gen FOXO3, que una vez lograda, fue efectuada en las muestras problema. Posteriormente se enviaron a secuenciar estos fragmentos amplificados para comprobar si efectivamente existía algún polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Se corroboró finalmente, tras su análisis en *BioEdit*, que había una posibilidad muy baja de que esa hipótesis fuese cierta, ya que además de encontrarse inserciones en las muestras más longevas, se halló en alguna muestra que no lo era, y por tanto, se concluyó que no había SNPs. Además, estas inserciones coincidían con la zona de hibridación de los primers, por lo que los resultados no eran fiables. Por ello, se sugieren futuros estudios con una zona de amplificación mayor para el gen FOXO3 para ratificar o descartar nuestra hipótesis con mayor seguridad.

INGLÉS

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a rare disease that is accompanied by a gradual degeneration of the upper and lower motor neurons. Familial ALS has been studied in this scientific research since the mouse model used (hSOD1-G93A) corresponds to this type of ALS. The aim of this TFG was to study various areas of a gene or genes that could be related to longevity in this model, trying to find out if there are mutations in these genes that may influence the survival of these animals. After genotyping the mice, and considering their longevity, the FOXO3 gene was selected, due to the fact that the relationship with the life expectancy of the people seemed to be promising to find similar results in these animals. Therefore, the design of the primers that were needed to perform the amplification by PCR of this gene in the samples was carried out. Moreover, it was also necessary to fine-tune the PCR

for the FOXO3 gene, which once achieved, was conducted in the test samples. Thereupon, these amplified fragments were sent to be sequenced to verify if there was a single nucleotide polymorphism (SNP) indeed. Finally, the analysis of the samples with *BioEdit*, corroborated that there was a very low possibility that this hypothesis was true, since in addition to finding insertions in the most long-lived samples, it was found too in a sample that was not long-lived, and therefore, it was concluded that there were no SNPs. Besides, these insertions coincided with the hybridization zone of the primers, so the results were not reliable. Thus, future studies with a larger amplification zone for the FOXO3 gene are suggested to ratify or discard our hypothesis with greater safety.

INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica o ELA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta directamente a las neuronas responsables de controlar el movimiento voluntario de los músculos. La ELA se caracteriza por una degeneración progresiva de las motoneuronas superiores e inferiores. En las fases iniciales de esta patología, los pacientes padecen síntomas como debilidad muscular, fasciculaciones, atrofia muscular e hiperreflexia (Morrice, Gregory-Evans, y Shaw 2018). Por ello, debido a esta parálisis gradual, los enfermos acaban falleciendo al cabo de 3 a 5 años a causa de un fallo respiratorio, por lo que finaliza originando un cuadro fatal.

En cuanto a la patogenia, el término “esclerosis lateral” hace referencia a la dureza, que sucede por la cicatrización localizada en los tractos anterior y lateral corticoespinales, y es debida a la degeneración de las motoneuronas de los mismos. Estos haces corticoespinales, llevan hacia la médula espinal los axones de las células premotoras de la corteza y el tronco encefálico (Leigh N. 2013). Por lo que corresponde a la neuropatología, conlleva varios procesos que suceden en los pacientes de ELA, como la hinchazón de neurofilamentos en los axones proximales o la reducción del calibre del axón distal (Figura 1). A medida que la enfermedad evoluciona, estas neuronas premotoras y la médula espinal se van degenerando paulatinamente, lo que conlleva una pérdida gradual de la fuerza muscular, que conduce a una parálisis y a una pérdida de la función de los músculos, habiendo alguna excepción, como la de los músculos que controlan el movimiento voluntario de los esfínteres de la vejiga, o los que participan en la inervación de los ojos. Por último, y entre otros motivos que pueden ser los causantes de esta enfermedad, se encuentra el glutamato, el cual transporta señales nerviosas entre las neuronas, y su contenido excesivo parece ser causante de esta patología del mismo modo.

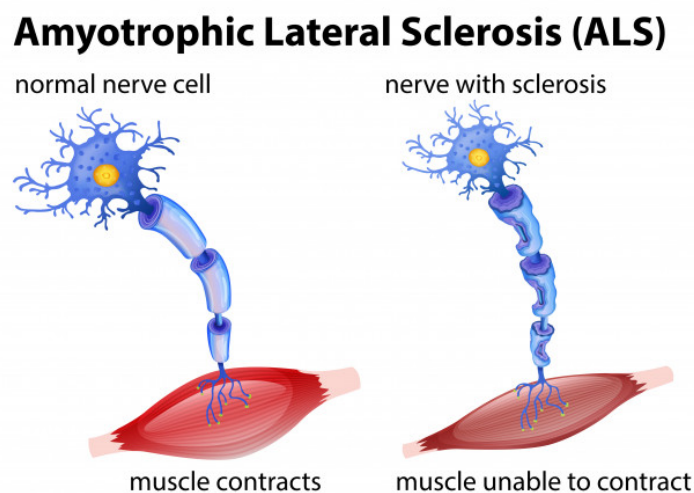


Figura 1: Dibujo esquemático comparativo de una motoneurona normal y una motoneurona de un paciente con ELA. Fuente: Freepik.

La ELA puede clasificarse en dos tipos según el origen de la enfermedad: La **ELA esporádica**, en la cual éste se desconoce, y la **ELA familiar**, que guarda una relación con componentes genéticos o hereditarios.

La ELA se encuentra clasificada dentro de las denominadas “enfermedades raras”, ya que afectan a un grupo pequeño de la población, y además, hasta el momento no hay tratamiento, siendo el único medicamento que se administra a estos pacientes el Riluzol con resultados muy limitados (Beghi *et al.* 2011, Miller, Mitchell, y Moore 2012).

La falta de marcadores de la enfermedad hace que su diagnóstico sea tardío y su pronóstico, incierto, resultando muy variable entre pacientes. Por estos motivos, es de gran importancia tener en cuenta y conocer biomarcadores de pronóstico de la enfermedad, que podrían emplearse como potenciales dianas terapéuticas (Azuaje 2010). Entre estos biomarcadores, pueden resultar de interés aquellos relacionados con la longevidad, entre los que sería probable que alguno de ellos guardara relación con una mutación que se correlacione con la esperanza de vida en enfermos de ELA. Este hallazgo, permitiría ralentizar el progreso degenerativo de la enfermedad además de encontrar terapias más eficaces para la misma.

De los pacientes que padecen la ELA, el 5-10% presentan la de tipo **familiar**. Se ha demostrado que un 20% de los casos de ELA familiar estaban asociados a una mutación en la **Cu/Zn superóxido dismutasa 1 (SOD1)**, lo que supone un 2-3% del total del total de personas que tienen la enfermedad (Rosen *et al.* 1993). Esta mutación implica un bajo nivel de esta proteína, que, entre otras consecuencias, conlleva una alteración del potencial de la membrana mitocondrial, lo que supone un alto nivel de especies reactivas de oxígeno (Beghi y Mennini 2004).

De interés para este estudio resulta el gen FOXO3 humano, un gen asociado a la longevidad, y que, junto a la cascada HSF1-FOXO3-SOD2/CAT/GADD45A actúan en la respuesta al estrés celular y la supervivencia, y entre otros, promueven la desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno. Este gen comprende cuatro exones y tres intrones, pero solo los exones 2 y 3 se transcriben y traducen activamente a la proteína FOXO3. En este gen, el intrón 2 es muy grande (101.625 pares de bases) y contiene un sitio de unión a p53 que puede activar la expresión de FOXO3 en respuesta al daño en el ADN (Renault *et al.* 2011, Grossi *et al.* 2018). A raíz de estudios que han hallado una correlación de este gen con la esperanza de vida en la especie humana, podría ser de gran utilidad conocer también si esto mismo sucede en pacientes de ELA y si ello se debe a una mutación, pues no se ha descrito ninguna mutación en este gen relacionada con la longevidad en la ELA todavía.

MODELO DE RATONES hSOD1-G93A

Características del modelo hSOD1-G93A

Para llevar a cabo este modelo creado por Gurney en 1994 (Gurney *et al.* 1994), los ratones tienen su propia SOD1 sin mutar, y además, se les añade **SOD1 mutada de procedencia humana**, de ahí proviene la primera parte de su designación: hSOD1.

Asimismo, expresarán una mutación en el codón 93 donde la base guanina, está sustituida por adenina: **G93A**.

No obstante, se descubrió en el 2011 que existe otra proteína en humanos (DeJesus-Hernandez *et al.* 2011) codificada por el gen **chromosome 9 open Reading frame 72** (c9orf72) cuya repetición de nucleótidos es más común que la SOD1. Esta se ha observado en un 40% de los casos de ELA familiar y también en ELA esporádica, aunque no se ha conseguido todavía un modelo animal para esta proteína.

Los ratones de este estudio pertenecen a *The Jackson Laboratory*.

Identificación de los ratones

Para llevar a cabo este proceso, los ratones deben de ser fácilmente reconocibles. Para ello, a los 7 días de edad se realiza un corte en la primera falange de uno o dos dedos según corresponda con su identificación como se indica en la Figura 2:

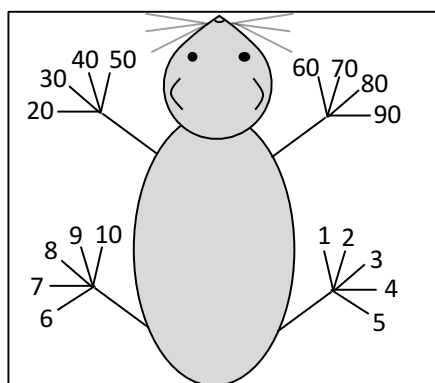


Figura 2: Dibujo esquemático de la identificación de los ratones.

Se comienza a contabilizar por la extremidad posterior derecha del animal, y, en posición decúbito esternal, en sentido de las agujas del reloj se enumeran los dedos. Como ejemplo, para identificar al ratón número 28, se corta la primera falange del dedo correspondiente al número 20 y otra al número 8. Así, aquellos ratones con identificación mayor de 9, tienen dos falanges cortadas.

Desarrollo de la enfermedad en este modelo animal

La vida de los ratones se divide en distintas fases, las cuales comienzan a partir de su nacimiento. Estos se destetan tempranamente a los 21 días de edad. Las etapas de la enfermedad son las siguientes:

1. **Hasta 40 días post nacimiento (P40):** están asintomáticos, aunque, no obstante, mediante electromiografía ya se puede constatar la enfermedad.
2. **Hasta P60 o fase sintomática temprana:** comienzan a aparecer los primeros síntomas de la ELA.
3. **Hasta P90 o sintomática tardía:** los síntomas son más avanzados, como demuestran los tests de comportamiento: en el rotarod los ratones se caen cuando estando completamente sanos no lo harían, y si se les sitúa agarrados a una rejilla boca abajo, aguantan menos de 3 minutos sin caerse.
4. **Hasta P120 o sintomática final:** Este periodo presenta una alta variabilidad, ya que los animales tienen un amplio rango de días hasta llegar a esta fase.

Por último, se establece un **punto final humanitario**, que sucede cuando ya no son capaces de, al posicionarse en decúbito supino, darse la vuelta por sí mismos en 30 segundos como máximo, siendo sacrificados con CO₂ o por medio de la dislocación.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fin de grado (TFG) es estudiar diversas zonas de un gen o genes relacionados con la longevidad en un modelo animal de ELA. Los genes diana que se analizarán en este trabajo ya han sido estudiados previamente en otras especies o modelos animales y se ha demostrado su correlación con la longevidad. Sin embargo, se desconoce si existen mutaciones de estos genes en nuestro modelo animal que puedan influir en la supervivencia.

METODOLOGÍA

GENOTIPADO DE RATONES hSOD1-G93A

Extracción de ADN genómico

En primer lugar, debe extraerse el ADN de los ratones hSOD1-G93A para, a continuación, poder llevar a cabo la PCR y detectar la mutación de la SOD1 en los animales transgénicos.

Este proceso se realizará a temperatura ambiente, ya que el ADN es muy estable, partiendo de **muestras** de falanges de ratones que se encuentran en tubos de ensayo.

Después se deben añadir 300 µl de **NaOH 50 mM** (Anexo I) con una micropipeta. Este agente alcalino se emplea para debilitar la estructura de la membrana celular, y por tanto, liberar el

ADN. Esto ocurre a 98°C , por ende, el termobloque que se utiliza de forma posterior, debe calentarse a esta misma temperatura.

Se sitúan las muestras en un **termobloque** a 98°C y 400 rpm durante 60 minutos o hasta la lisis completa del tejido. A continuación se neutralizan con 30 µl de **Tris 1M** a pH 8 (Anexo I) para proteger el ADN de posibles cambios de pH y estabilizarlo. Para que se incorporen correctamente, se agitan las muestras en el **vórtex**.

Posteriormente se **centrifugan** a 14000 rpm durante 6 minutos. Por último, se debe transferir el sobrenadante de cada tubo de ensayo a otro nuevo y guardar a -20°C hasta su empleo.

PCR

La PCR, o reacción en cadena de la polimerasa, comprende una técnica desarrollada a principios de 1980 por Kary Mullis (Carreño y Castillo, 2001). Aplicando esta técnica, se puede obtener una gran cantidad de una secuencia específica de ADN mediante su **amplificación**. Así, gracias a la PCR, se pueden llegar a detectar cantidades de ácidos nucleicos muy bajas, lo cual supone una gran ventaja para su posterior análisis.

La PCR engloba diferentes **etapas**, que se pueden resumir de la siguiente manera:

1. **Desnaturalización:** para lograr una separación de las cadenas de ADN, se debe someter a las muestras a temperaturas altas.
2. **Hibridación de los primers con las cadenas desnaturalizadas de ADN:** los primers son oligonucleótidos sintéticos que delimitarán la región que se desea amplificar. Se deben utilizar dos primers distintos, uno para la cadena ADN genómica (*forward*) y otro para la cadena antígenómica (*reverse*). La temperatura a la que se trabaja deberá ser aquella que se encuentre unos grados por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los primers, para lograr una correcta hibridación. Para la elección de los primers, se tendrán que tener en cuenta 2 criterios fundamentales: su secuencia debe estar conservada en todas las variantes descritas del ADN que se pretende detectar, y además, ser específica del mismo; y, por otra parte, los dos primers no podrán ser complementarios para, de este modo, evitar que se hibriden entre ellos mismos.
3. **Elongación:** de nuevo, en este paso, se aumenta la temperatura, aunque por debajo de la temperatura de desnaturalización, para dar paso a la actuación de la ADN polimerasa, que se encarga de sintetizar a partir de los extremos 3'OH libres de los primers la cadena complementaria a la que el primer ha hibridado. Se obtiene así, una cadena doble de nuevo en ambas cadenas, lo cual ha multiplicado por 2^n (donde n es la cantidad de ciclos aplicados), el número de cadenas que había en un principio.

Estas etapas se repiten un determinado número de veces, denominadas ciclos, hasta que finalmente, cuando se alcanzan la cantidad de ciclos deseados, se conservan las muestras a una temperatura constante y baja para su posterior uso.

En el estudio que nos concierne, la PCR se efectúa para poder discernir entre aquellos ratones que presenten la patología, y aquellos que no tienen la mutación en la SOD1 mutada de procedencia humana. Con el objetivo de lograr esta distinción, se emplearán **dos parejas de primers**:

- Una pareja de primers servirá para la posterior elongación del fragmento de la mutación SOD1 humana, logrando identificar los animales enfermos.
- Por otro lado, la segunda pareja de primers se utiliza para comprobar la presencia de un fragmento de ADN común en todos los ratones, y, en este caso, se ha escogido el gen de la Interleucina-2 (IL-2).

Por consiguiente, al visualizar el gel de agarosa tras la realización de la PCR en los ratones que contengan la **el gen humano**, se observarán **dos bandas**, la de la mutación y la del gen de la IL-2. En contraste, si el **ratón no contiene la SOD1 humana**, sólo presentará **una banda** en el gel de agarosa correspondiente también al gen de la IL-2 amplificado.

Mix para PCR:

Para efectuar la PCR, se emplearon distintos reactivos para los siguientes usos y en las cantidades que se detallan a continuación en la tabla 1:

Reactivo	1X
H ₂ O	12
dNTPS 1.25 mM	3,2
BUFFER 10X incomplet	2
MgCl ₂ 100mM	0,4
OIMR42 20 µM	0,4
OIMR43 20 µM	0,4
OIMR113 20 µM	0,2
OIMR114 20 µM	0,2
Taq	0,2
ADN de la muestra	1
Volumen final	20 µL

Tabla 1: Mezcla para llevar a cabo el mix para el genotipado de las muestras.

Los reactivos de la mezcla se añadieron con los siguientes fines:

- **H₂O**: Para diluir la muestra.
- **dNTPS**: Son los nucleótidos para la elongación.
- **Buffer**: Mantiene el pH para evitar alteraciones.
- **MgCl₂**: Se emplean iones divalentes para que actúen como cofactores de la ADN polimerasa.
- **OIMR**: Comprenden las dos parejas de primers necesarios para la hibridación y posterior elongación del gen SOD1 humana (113 y 114) e IL-2 (42 y 43).
- **Taq**: Es una enzima polimerasa que proviene de la bacteria termófila *Termophilus aquaticus*, y que trabaja elongando a temperaturas de 72°C, lo cual limita la temperatura de dicha fase.

El hecho de usar dos primers a la vez, significa que funciona la PCR, y al visualizarlos, también nos aseguramos que funciona la reacción. Asimismo, los primers tienen que tener temperaturas de fusión similares y que el fragmento que amplifiquen tenga distinto tamaño para poder distinguirlos en el gel de electroforesis. En este caso, la IL2 contiene 324 pares de bases y la SOD1, 236.

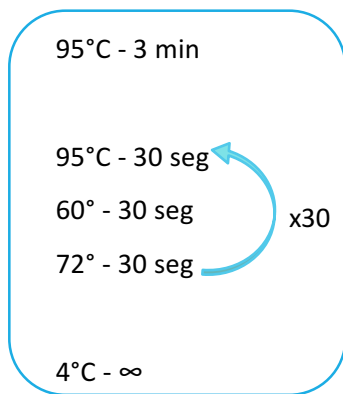
Además de para el número de muestras que se van a amplificar, se debe **añadir cantidad extra** para un control positivo (con SOD1 humana), un control negativo (sin SOD1 humana) y un blanco (sin ADN para verificar que no se ha cometido ningún error).

Programación termociclador

Una vez preparado el mix para PCR, se añade cada muestra junto a sus reactivos en un tubo individual.

A continuación, se procede a encender el termociclador, que es un aparato capaz de realizar los ciclos de la PCR a las temperaturas programadas en el tiempo que se requiere. Antes de introducir nuestras muestras en el dispositivo, se les aplica agitación con el **vórtex** para lograr soluciones homogéneas y se **centrifugan** las muestras hasta alcanzar los **16000 rpm**.

A 95°C se producirá la desnaturalización, a los 60°C la hibridación (siendo esta la temperatura óptima de nuestros primers, ya que cada primer tiene su temperatura óptima), y a los 72°C la elongación, repitiéndose esto **30 veces**. De esta manera, el esquema de la PCR quedaría del siguiente modo:



Gel agarosa 2% en Tris-borato-EDTA (TBE) 1x

La visualización de los fragmentos amplificados por PCR se realizará mediante una electroforesis. Una vez finalizados los 30 ciclos de la PCR, se deben cargar las muestras en el gel de agarosa al que posteriormente se someterá a dicha electroforesis, y que previamente ha sido preparado del siguiente modo:

1. Se pesan 2 g de **agarosa** y se sitúan en un Erlenmeyer.
2. Se vierten en el Erlenmeyer 100 mL de **TBE 1x** para conseguir a posteriori un gel a una concentración del 2%. El TBE es una disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA, de uso frecuente en electroforesis, en especial en gel de agarosa para separar ácidos nucleicos. El Tris es la molécula responsable del tamponamiento (regulación del pH). El borato contribuye a ajustar el pH deseado e igualmente a mantenerlo. El EDTA es un quelante de cationes divalentes (Ca, Mg, Zn...) cuya función es secuestrar el Mg^{2+} , con lo que se evita que las posibles nucleasas presentes degraden los ácidos nucleicos de la muestra (la mayoría de las nucleasas requieren Mg^{2+} como cofactor).
3. Se procede a **mezclar** la agarosa con el tampón y **fusionar** los componentes para obtener el gel. Para ello, se necesita una fuente de calor como un microondas, que permite realizar el proceso más rápidamente. Esta fusión del polisacárido agarosa con el tampón da lugar a una matriz de moléculas del polisacárido que se mantienen unidas a través de puentes de hidrógeno, entre las cuales se forman poros que permitirán el avance de las muestras una vez se proceda a la electroforesis.
4. Finalmente se añaden 8 μ L de **GelGreen®** (diluido 1:5) en una campana de extracción al volumen de 100 mL 2% agarosa. El GelGreen® es un colorante fluorescente de ácidos nucleicos que se utiliza con mucha frecuencia en la actualidad y que permitirá visualizar tras la electroforesis, las bandas de las muestras con la luz UV.

A continuación, se vierte esta mezcla en un molde donde previamente se han colocado unos peines para formar los pocillos donde se cargarán las muestras. Tras unos 15 minutos a temperatura ambiente se polimeriza el gel.

Carga de las muestras de PCR en el gel agarosa

Se preparan unos tubos eppendorf donde se añade a cada uno 10 µL de sendas muestras y 5 µL de un tampón de carga. Este tampón contiene **azul de bromofenol**, que permite la visualización de las muestras cuando son colocadas en los pocillos, además de ver cómo migran las muestras en el gel. También, tiene **glicerol**, dado que es un compuesto de alto peso molecular que ayudará a que las muestras vayan al fondo del pocillo en vez de dispersarse al ser depositadas.

Una vez colocado el gel en una cubeta de electroforesis, se añade un **tampón de electroforesis (TBE 1X)** hasta cubrir el gel completamente.

Finalmente, se centrifugan 5 segundos las muestras con el tampón de carga para homogeneizar la mezcla, y se toman 10 µL de la mezcla para depositarlas en los pocillos del gel.

Electroforesis

La electroforesis es una técnica que se emplea actualmente para extraer datos muy diversos del ADN con el que se quiere trabajar y de otro tipo de moléculas. Consiste en la **separación de dichas moléculas**, que se mueven gracias a un campo eléctrico, y que avanzan a través de distintos soportes.

En este caso, se utiliza el **gel de agarosa** para que actúe como soporte de la electroforesis. Para poner en funcionamiento la electroforesis, se conectan los polos y se pone a correr la misma con una intensidad de corriente de aproximadamente 60 mA. El ADN tiene carga negativa, y se sitúan los pocillos en el polo negativo, por tanto, **al comenzar la electroforesis, la muestra se desplazará hacia el polo positivo**, es decir, el polo opuesto.

Pasados aproximadamente 30 minutos, y tras comprobar que el frente de banda se ha desplazado lo suficiente, se sitúa el gel en un transiluminador donde con ayuda de luz ultravioleta se podrán visualizar los fragmentos de ADN.

ELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para tratar de discernir si guarda algún tipo de relación la secuencia de la FOXO3 respecto a la longevidad de los animales, se consensó analizar por duplicado distintos ratones **todos positivos a la SOD1**, cuya longevidad es un dato que ya se tenía en el laboratorio porque un estudio de supervivencia requiere un periodo muy largo en el tiempo, a parte de que requiere tener acceso al animalario. Para ellos, se hicieron 3 grupos de ratones (tabla 2) en función de su longevidad: los que vivían poco, los que vivían mucho, y un tercer grupo a cuyo grupo

pertenecen ratones provenientes todos de una misma camada y que sorprendentemente mostraron una supervivencia muy elevada para este modelo. Las características mostradas fueron las siguientes:

Número de animal	Número PCR	Color	Sexo	Madre	Padre	Grupo	Superv. (días)
OOGA2626	1 y 2	P	M	OODB0062	OOGA2292	No longevo	115
OOGA2617	3 y 4	MC	M	OODB0076	OOGA2332	No longevo	115
OOGA2693	5 y 6	P	M	OODB0071	OOGA2308	Longevo	139
OOGA2652	7 y 8	B	M	OODB0063	OOGA2235	Longevo	143
OOGA2644	9 y 10	N	M	OODB0080	OOGA2311	Muy longevo	>180
OOGA2641	11 y 12	P	M	OODB0080	OOGA2311	Muy longevo	>180
OOGA2630	13 y 14	P	H	OODB0062	OOGA2292	No longevo	126
OOGA2688	15 y 16	P	H	OODB0067	OOGA2273	No longevo	126
OOGA2673	17 y 18	P	H	OODB0081	OOGA2282	Longevo	145
OOGA2704	19 y 20	P	H	OODB0073	OOGA2255	Longevo	148
OOGA2649	21 y 22	N	H	OODB0080	OOGA2311	Muy longevo	>180
OOGA2647	23 y 24	P	H	OODB0080	OOGA2311	Muy longevo	>180

Tabla 2: Relación de ratones para nuestro estudio con su longevidad y parentesco. M: macho; H: hembra; P: pardo; MC: marrón claro; B: blanco; N: negro.

GENES RELACIONADOS CON LA LONGEVIDAD

Búsqueda de genes

En primer lugar, se decidió realizar una búsqueda en la base de datos de PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Se determinó que, para acotar más los genes de interés que se precisaban, se iban a tratar de localizar aquellos artículos que tratasen sobre genes relacionados con la longevidad, y que esos mismos existieran en ratones transgénicos y con la SOD1G93A.

Para ello, se efectuó una búsqueda bibliográfica dentro del apartado *gene* de la página web, donde se hallaron las siguientes proteínas potencialmente útiles para nuestro estudio, resultando de interés las siguientes:

- **Neurotrofina 4 (NT4)** (Rando *et al.* 2018, Kaal 1997).
- **Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF)** (Rando *et al.* 2018, Funakoshi *et al.* 1995, Mantilla, Zhan, y Sieck 2004, Keller-Peck *et al.* 2001).

- **Colágeno tipo XIX ALFA 1 (Col19a1), Glutathione reductase (Gsr), Nexina corta 10 (Snx10), Calmodulina 1 (Calm1) y Factor potenciador específico de miocito 2C (Mef2c)** (Calvo *et al.* 2012).
- **L-metionina S-sulfomixina (LS MSO)** (Brusilow 2017).

Sin embargo, para poder llevar a la práctica un experimento que guardase una relación más estrecha con la patología que padecen las personas, se determinó proceder a delimitar la búsqueda para localizar un gen o genes que se correlacionen con la **longevidad en la especie humana**. Fruto de esta búsqueda, se halló el gen **FOXO3**, cuyas características eran interesantes para continuar con la investigación.

Diseño de los primers

Para llevar a cabo las PCRs necesarias para analizar este gen, se precisa una pareja de primers que fue seleccionada del siguiente modo:

1. Se buscó para la especie *Mus musculus* en *GenBank* (*GenBank*) la secuencia de pares de bases que conforman dicho gen.
2. Se seleccionaron dos primers, *reverse* y *forward*, para la amplificación del fragmento p53-4 (Renault *et al.* 2011). Para averiguar la secuencia correspondiente al primer *reverse*, se invirtió la misma y se anotó la cadena complementaria.
3. A continuación, a través de dos herramientas informáticas, *Primer-BLAST* (Primer-BLAST) y *Primer3* (Primer3), se diseñaron los primers necesarios para proceder a la PCR.

PUESTA A PUNTO DE LA PCR

Primera PCR

Tras la recepción de los primers solicitados, se procedió a su reconstitución ya que ambos se encontraban liofilizados. Para que los resultados de la PCR definitiva sean específicos es primordial en primer lugar poner a punto la PCR, es decir, ajustar la cuantía necesaria de cada componente del mix para que no surjan, entre otros, bandas inespecíficas. Para ello, se llevó a cabo una PCR con **tres mixes** cuya mezcla se refleja en las tablas 3, 4 y 5:

Mix para FOXO3		
Reactivo	[C] _{final}	1X
H ₂ O		12,6
dNTPS 1.25 mM	0,2 mM	3,2
BUFFER 10X incomplet	1x	2
MgCl ₂ 100mM	2 mM	0,4
Primer F 20 µM	300 nM	0,3
Primer R 20 µM	300 nM	0,3
Taq		0,2
ADN de la muestra		1
Volumen final		20 µL

Tabla 3: Mix para la PCR de FOXO3

Mix para SOD1		
Reactivo	[C] _{final}	1X
H ₂ O		12,6
dNTPS 1.25 mM	0,2 mM	3,2
BUFFER 10X incomplet	1x	2
MgCl ₂ 100mM	2 mM	0,4
OIMR113 20 µM	300 nM	0,3
OIMR114 20 µM	300 nM	0,3
Taq		0,2
ADN de la muestra		1
Volumen final		20 µL

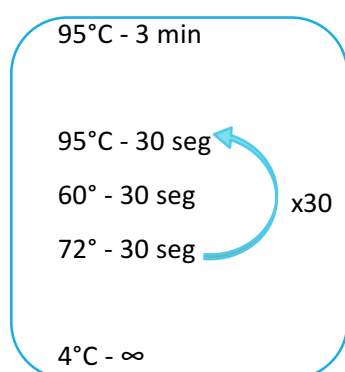
Tabla 4: Mix para la PCR de SOD1

Mix para IL2		
Reactivo	[C] _{final}	1X
H ₂ O		12,6
dNTPS 1.25 mM	0,2 mM	3,2
BUFFER 10X incomplet	1x	2
MgCl ₂ 100mM	2 mM	0,4
OIMR42 20 µM	300 nM	0,3
OIMR43 20 µM	300 nM	0,3
Taq		0,2
ADN de la muestra		1
Volumen final		20 µL

Tabla 5: Mix para la PCR de IL2

Se elaboró cada mix por triplicado, debido a que dos mezclas eran para una misma muestra, y otra servía para tener un blanco y comprobar que no hubo ningún error al realizar el mix. La muestra de ADN con lo que se llevó a cabo la PCR, era la de un animal que, al genotipar, había resultado como positivo a la SOD1, y por ello, para constatar que la PCR estaba bien realizada, se hizo también un mix para IL2 y SOD1.

Tras la elaboración de los mixes, se **efectuó la PCR** correspondiente, cuyos parámetros introducidos fueron:

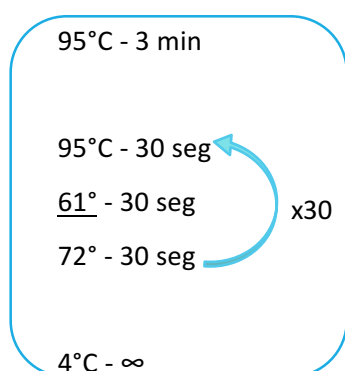


Posteriormente, se llevó a cabo la elaboración del **gel de agarosa 2% en TBE 1x** y se dejó enfriar para su adecuada gelificación. Para finalizar, se prepararon nuevos tubos, donde se añadieron sendas muestras y tampón de carga para la PCR. De forma adicional, se incluyó un **marcador de bases** para conocer si las bandas que aparecieran en la electroforesis se correspondían efectivamente con el gen de interés. Este marcador de bases comprende bandas de **100 pares de bases**, desplazándose más aquellas bandas con menor número, por ende, en primer lugar aparecerá abajo la banda concerniente a 100 pares de bases, la más

próxima por encima, a 200 pares de bases, y así sucesivamente. Para corroborar que se trata de la FOXO3, la banda debe aparecer en la zona de 165 pares de bases. Como último paso, se ejecutó la electroforesis y se visualizó mediante luz UV los resultados.

Segunda PCR

Posteriormente, se decidió realizar una segunda PCR ya que no se obtuvo una PCR precisa en el anterior experimento. Para ello, se consensó **aumentar un grado la T_m** ya que los primeros precisaban una T_m algo más alta según el laboratorio *Invitrogen* (dada la alta cantidad de G y C en el fragmento a amplificar), resultando la PCR del siguiente modo:



En esta ocasión, se idearon **6 mixes** distintos para tratar de hallar la mezcla más adecuada para la FOXO3. Los parámetros que se alteraron fueron, dependiendo de cada mezcla:

- **Bajar la concentración de MgCl₂ (Mg²⁺)**, ya que aumenta la especificidad de la reacción.
- **Bajar la concentración de los primers**, puesto que también resulta con un incremento en la especificidad de la PCR.
- **Bajar la concentración de ADN**, debido a que, aún disminuyendo, sigue habiendo cantidad suficiente para la realización de la PCR.

De este modo, se decidió realizar por **triplicado cada mix** para analizar dos muestras distintas positivas a SOD1, y una para el blanco, por tanto, los **6 mixes** que se decidieron preparar para esta PCR tenían las cantidades que se muestran en la tabla 6:

Mixes para la puesta a punto de la PCR						
Reactivo	[C] _{final} de A	[C] _{final} de B	[C] _{final} de C	[C] _{final} de D	[C] _{final} de E	[C] _{final} de F
H ₂ O						
dNTPS 1.25 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
BUFFER 10X incomplet	1x	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂ 100mM	2 mM	<u>1 mM</u>	2 mM	2 mM	2 mM	<u>1 mM</u>
Primer F 20 µM	300 nM	300 nM	<u>200 nM</u>	300 nM	<u>200 nM</u>	<u>200 nM</u>
Primer R 20 µM	300 nM	300 nM	<u>200 nM</u>	300 nM	<u>200 nM</u>	<u>200 nM</u>
Taq						
ADN de la muestra	2	2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
Volumen final	40 µL					

Tabla 6: Concentración final de cada reactivo en relación a los diferentes mixes para la puesta a punto de la PCR.

En este caso, se aumentó a 40 µL el volumen final porque, de este modo, se tenía el volumen necesario para su posterior secuenciación también. Tras la elaboración de las distintas mezclas por triplicado (dos veces cada muestra más un blanco), se siguió la misma metodología explicada en el apartado de genotipado.

PCR final

A continuación, se procedió a preparar las mezclas para llevar a cabo la PCR. Los parámetros empleados fueron los del **mix F de la segunda PCR**. Para su puesta en marcha, se realizaron **por duplicado las mezclas** para cada muestra, y se preparó una cantidad suficiente de mix para 25 muestras (24 de las 12 muestras por duplicado junto a 1 del blanco). Al llevar a cabo la mixtura de las muestras de los ratones con la mezcla de la PCR, se siguió la misma metodología anterior para la preparación del gel de agarosa y la electroforesis.

PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS AMPLIFICADAS

Procediendo con el análisis de las muestras, se contempló enviarlas a secuenciar, sin embargo, antes de ello, los fragmentos de ADN amplificados en las PCRs debían pasar por un proceso de purificación. Por este motivo, se empleó el **protocolo *illustra™ ExoProStar™ 1-Step***, cuyo fin es el eliminar los cebadores (primers) y nucleótidos (dNTPs) que no han sido incorporados,

todo ello sin degradar el fragmento de ADN previamente amplificado, para optimizar la posterior secuenciación. De este modo, la mezcla para el protocolo se denomina **exosap**, cuyo contenido es una amalgama de Fosfatasa Alcalina (que cataliza la desfosforilación de nucleótidos y dNTPs no incorporados) y de Exonucleasa I (la cual libera monofosfatos de 5' de desoxirribonucleósidos (dNTPs)). En primer lugar, se procedió a la **purificación, que se realizó por duplicado**, ya que posteriormente se necesitaría una muestra por cada primer (*forward* y *reverse*). El protocolo aplicado se llevó a cabo a unas temperaturas y cantidades diferentes a las que indicaba la casa comercial, ya que se habían optimizado en nuestro laboratorio:

1. Se tomaron 10 µL de cada muestra y se adicionaron 4 µL de la mezcla *pool* (1 µL de exosap y 3 µL de H₂O mQ).
2. Se realizó un ciclo en el termociclador con los siguientes tiempos y temperaturas: 37°C durante 45 minutos, 80°C 15 minutos y después manteniendo las muestras a 4°C hasta su retirada del mismo.

Finalmente, se añade a cada muestra por duplicado sendos primers, cogiendo 10 µL de la mezcla anterior y añadiendo a una muestra 3 µL (10 pmol/µL) de primer *reverse*, y a la otra, 3 µL (10 pmol/µL) de primer *forward* respectivamente.

Estas muestras se conservaron a 4°C hasta que se enviaron al laboratorio *Stabvida* para su secuenciación con el fin de poder detectar posibles mutaciones. Posteriormente, se analizaron los resultados con el programa *BioEdit* y se anotaron los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conocimiento de aquellos biomarcadores moleculares que están implicados en el envejecimiento y la longevidad puede favorecer un mejor entendimiento de diversas enfermedades, especialmente las enfermedades neurodegenerativas. Por este motivo existen los modelos animales, los cuales son de utilidad para identificar posibles causas y mecanismos antes de proceder al siguiente paso, que es la realización de ensayos en humanos. En la ELA es de vital prioridad hallar alguno de estos biomarcadores, ya que estos enfermos tienen una esperanza de vida muy corta.

Uno de los genes candidatos con mayor potencial de relación con la longevidad humana es el FOXO3, como se ha evidenciado en varios ensayos (Renault *et al.* 2011, Grossi *et al.* 2018). La literatura también parece apoyar que el intrón 2 está muy correlacionado con la esperanza de vida, lo que puede suponer que sea un gen probable para analizar si existe un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en esa zona, y que se relacione con la longevidad de los animales (Renault *et al.* 2011). Debido a que en este experimento se ha visto distinta longevidad en los

ratones enfermos, se quiere conocer si existe algún SNP en el intrón 2 de la FOXO3 que pueda estar relacionado con la longevidad en este modelo animal.

GENOTIPADO DE RATONES hSOD1-G93A

Interpretación de la electroforesis:

Los resultados que obtuvimos en el genotipado se muestran en la Figura 3:

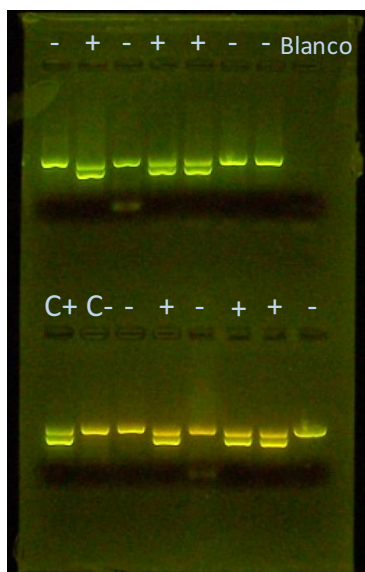


Figura 3: Resultado del genotipado.

-: Muestra negativa a la mutación de la SOD1. Sólo muestra una banda, la cual se corresponde a la amplificación del gen de la IL-2.

+: Muestra positiva a la mutación de la SOD1. En este caso se visualizan dos bandas, las cuales corresponden al gen de la SOD1 y al gen de la IL-2. Dado que la velocidad de migración es inversamente proporcional al tamaño del fragmento de ADN que forma la banda (cuanto más pequeño sea el fragmento o más compacto sea, más rápido migrará), se deduce que la banda que más ha migrado (más abajo), es la del gen de la SOD1, que es la banda que se visualiza en las muestras positivas de la Figura 3. Por otra parte, las bandas observadas en todas las muestras y que se encuentran más arriba en la Figura 3, corresponden al gen de la IL-2, que son de un mayor tamaño que el de la SOD1.

Blanco: Muestra **sin ADN**.

C+: Control positivo, cuyo contenido se conoce previamente, y se ha validado, categorizándola como muestra positiva, y por tanto, con la SOD1 humana. Sirve para comparar y conocer, efectivamente, qué muestras son positivas.

PUESTA A PUNTO DE LA PCR

Primera PCR

Tras llevar a cabo la primera PCR para la puesta a punto, este fue el hallazgo en la electroforesis, representados en la Figura 5:

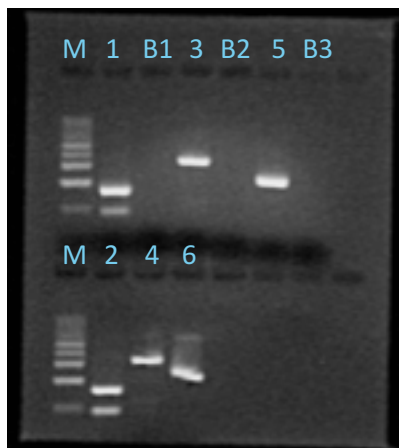


Figura 5: Resultado de la electroforesis de la primera puesta a punto de la PCR. Marcador de 100 pares de bases; (M). Solución correspondiente al FOXO3 (1 Y 2). Blanco para el mix de FOXO3 (B1). Bandas para el gen de la IL2 (3 y 4). Blanco para la mezcla del gen IL2 (B2). Bandas para el compuesto de la SOD1 (5 Y 6). Blanco para el mix de la SOD1 (B3).

Cabe destacar que, efectivamente las bandas se corresponden al gen buscado ya que comprenden: la FOXO3 165 pares de bases, la IL2 324 pares de bases y la SOD1 236 pares de bases. No obstante, se advierten bandas inespecíficas en el carril del gen de la FOXO3, por lo que se decide seguir averiguando cuáles serán las mejores condiciones para obtener una PCR altamente precisa. Como hallazgo casual, se percibe en la muestra 6 una banda que no se encuentra totalmente vertical, lo que podría explicarse por un enfriamiento del gel en una superficie que no era del todo horizontal. Además, y como cabría esperar, los blancos no mostraron ninguna banda, lo que justifica que los resultados obtenidos no presenten ninguna alteración.

Segunda PCR

Como consecuencia de la PCR anterior, se procedió a realizar una segunda PCR con todas las características anteriormente mencionadas, cuyo resultado se refleja en la siguiente imagen (Figura 6):

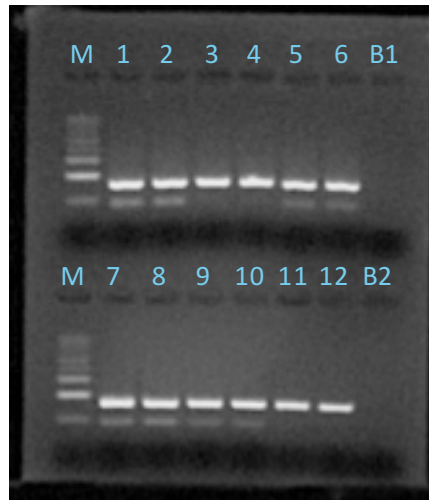


Figura 6: Resultado de la electroforesis tras realizar la segunda PCR de la puesta a punto. Marcador de 100 pares de bases (M). Muestras correspondientes al mix A (1 y 2). Bandas de la mezcla B (3 y 4). Solución que se corresponde al mix C (5 y 6). Blanco mezclado de las soluciones A, B y C (B1). Bandas de las muestras de la mezcla D (7 y 8). Correspondiente a la mezcla E (9 y 10). Muestras de la mezcla F (11 y 12). Mezcla de los blancos de D, E y F (B2).

Tras analizar los resultados visualizados, se percibieron bandas inespecíficas en las muestras que se correspondían a los mixes A, B (se advirtieron vagamente), C, D y E, por lo que se descartaron para proseguir analizando sucesivos ADNs. Sin embargo, la **mezcla F**, a la que se le había disminuido la concentración de Mg^{2+} , de primers y de ADN, y se le había aumentado un grado la temperatura con respecto a la primera PCR que fue exitosa, por lo cual, se decidió utilizar estas mismas cantidades para la PCR final.

PCR FINAL DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR

Al encender la luz UV, las bandas visualizadas fueron las representadas en la Figura 7:

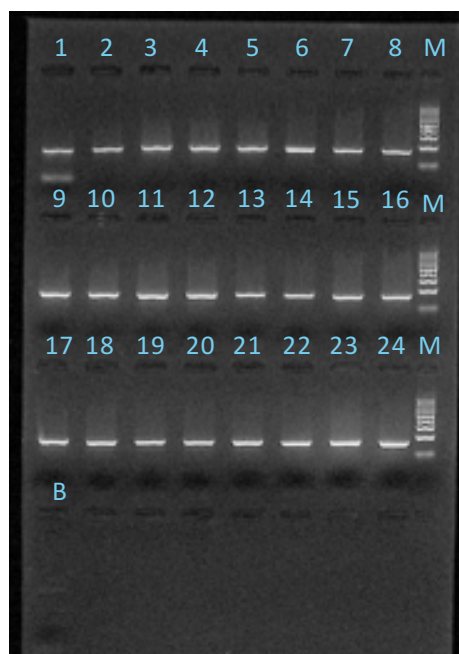


Figura 7: Resultado de la electroforesis tras realizar la PCR en las muestras finales a secuenciar. Muestra del ratón OOGA2626 (1 y 2). Muestra del ratón OOGA2617 (3 y 4). Muestra del ratón OOGA2693 (5 y 6). Muestra del ratón OOGA2652 (7 y 8). Muestra del ratón OOGA2644 (9 y 10). Muestra del ratón OOGA2641 (11 y 12). Muestra del ratón OOGA2630 (13 y 14). Muestra del ratón OOGA2668 (15 y 16). Muestra del ratón OOGA2673 (17 y 18). Muestra del ratón OOGA2704 (19 y 20). Muestra del ratón OOGA2649 (20 y 21). Muestra del ratón OOGA2647 (22 y 23). Marcador de 100 pares de bases (M). Blanco (B).

Se corroboró que, en efecto, las bandas pertenecían a FOXO3, ya que la línea se divide alrededor de las 165 pares de bases. De igual manera, en la primera muestra, cuyo ADN pertenece al ratón OOGA2626, aparece una banda inespecífica, cuya posible explicación se deba a una contaminación que surgió durante el procedimiento.

ANÁLISIS DE LA SECUENCIACIÓN

En primer lugar, se visualizaron los hallazgos encontrados para las doce muestras tanto para los cebadores *reverse* como *forward*. Estas muestras fueron numeradas del 1 al 12 (F o R) según el orden de la Tabla 2. Los resultados observados en la secuenciación de las muestras fueron los siguientes:

- No se encontraron hallazgos relevantes en las muestras 1F, 1R, 2F, 2R, 3F, 3R, 4F, 4R, 7F, 8F, 8R y 10F.
- Se hallaron **inserciones** (que podrían ser posibles SNPs) en diversas posiciones de las bases citosina (C) y adenina (A) como se muestra en la Figura 8, en las que, de acuerdo con la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) se procedió a

nombrar con la letra M. Las muestras que presentaban esta inserción fueron las 5F, 6F, 9F, 11F y 12F.

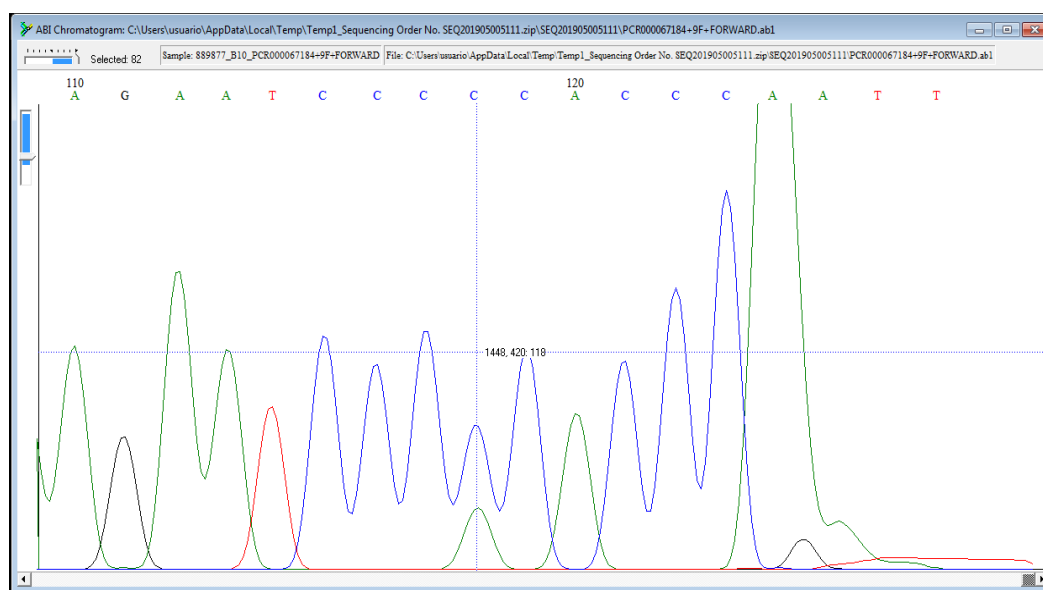


Figura 8: Resultado de la secuenciación de la muestra 9F, en la que se percibe una inserción de C y A en la posición 118.

- En otro orden de hallazgos, las muestras 5R, 6R, 7R, 9R, 10R, 11R y 12R presentaron una inserción en determinados lugares de adenina (A) y timina (T). Según la IUPAC, esto debe sustituirse por una W (Figura 9).

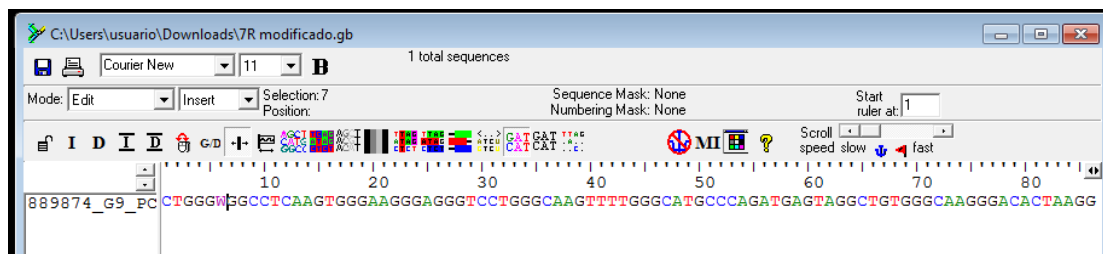
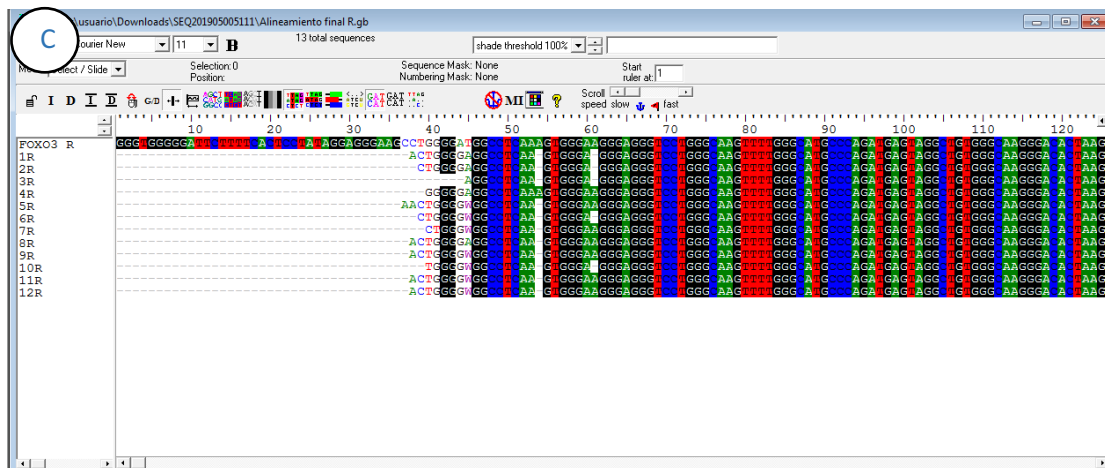
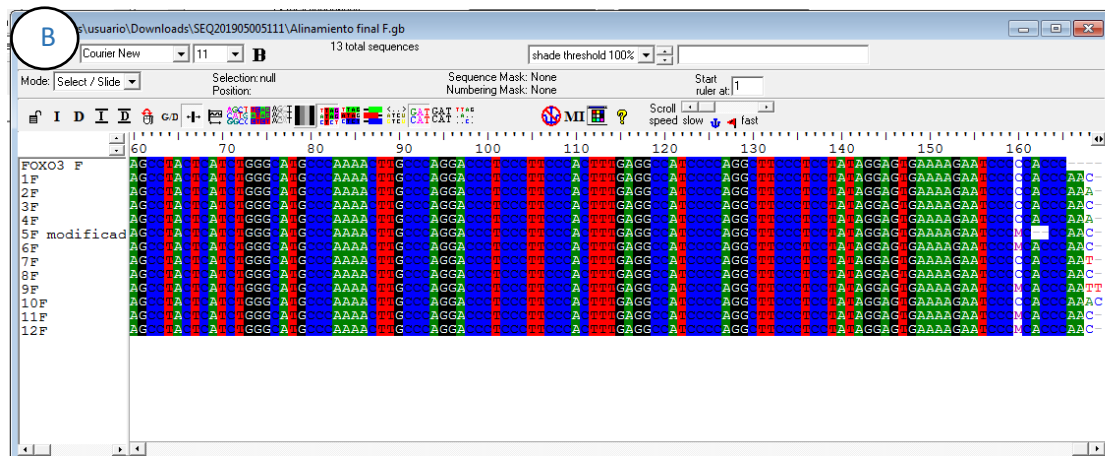
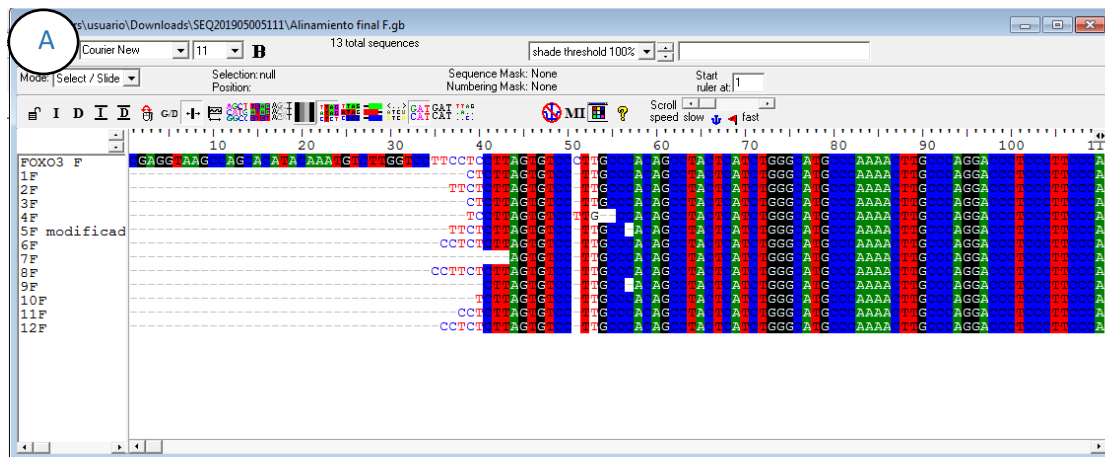


Figura 9: Sustitución de A y T en la muestra 7R por una W.

Para finalizar, se alinearon las secuencias de las 12 muestras secuenciadas *reverse* y *forward* con sendas muestras de la FOXO3 *reverse* y *forward*. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Figura 10):



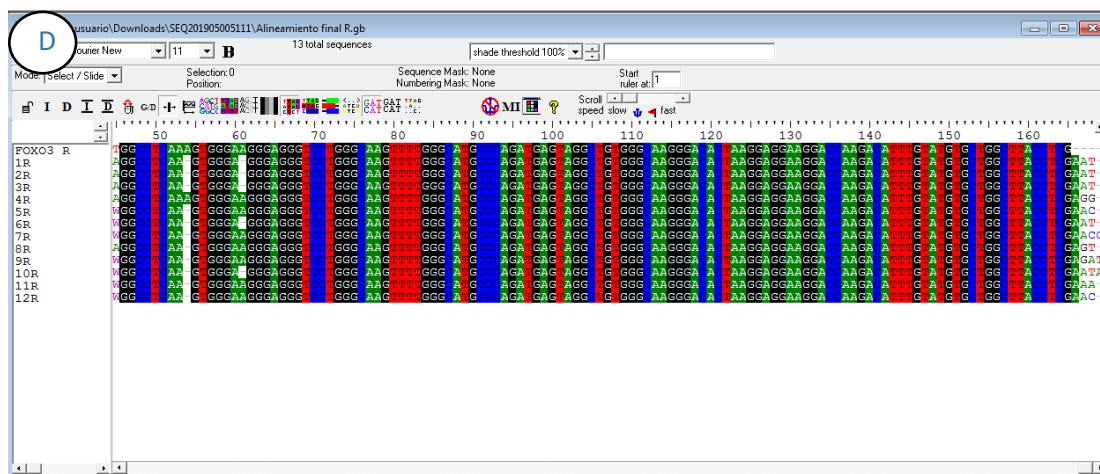


Figura 10: Resultado del alineamiento de las muestras forward con FOXO3 F (A y B) y de las muestras reverse con FOXO3 R (C y D).

Debido a que la secuencia de las muestras coincidía en la mayoría de sus bases, se pudo comprobar que no existía relación entre la longevidad de los ratones y este gen. El hecho que podría explicar el por qué no se han encontrado SNPs en FOXO3 en este estudio, pero sin embargo en otros sí, puede ser debido a que no esté relacionado con la ELA este gen aunque sí que lo esté con la longevidad de la especie humana; por este motivo, este gen podría no influir en el progreso de la enfermedad en el modelo animal estudiado. Dado que el origen de la enfermedad todavía es desconocido, se precisa continuar investigando otros genes que puedan guardar alguna relación con esta enfermedad, así como analizar otras zonas de este mismo gen que pudieran contener otras secuencias de unión a otros marcadores; estos marcadores sí que podrían ser relevantes en la ELA para descartar que este gen no tenga relación alguna con la enfermedad, ya que, en este caso, sólo se ha llevado a cabo el estudio en base a una zona que está descrita en la literatura.

Por otro lado, el estudio llevado a cabo en este trabajo y en particular en el modelo animal de ELA, no se ha descrito en la literatura a diferencia de otros modelos murinos (como el modelo de linfoma (Bouchard *et al.* 2007)), lo que permitirá en futuros estudios la identificación de nuevos SNPs que pueden estar relacionados con el progreso de la enfermedad en este modelo animal.

CONCLUSIONES

ESPAÑOL

1. En relación con la posibilidad de que existan SNPs en el gen FOXO3 que puedan estar relacionados con el aumento de la longevidad de los ratones, existe una probabilidad muy baja de que dicha hipótesis sea cierta en las muestras que hemos analizado.

2. A pesar de que se comprobó que en las muestras 5F, 6F, 11F y 12F había una inserción de C y A, y que justo coincidía con los ratones más longevos, se halló del mismo modo esta inserción en la muestra 9F, que no pertenecía al grupo de ratones muy longevos. Esto corrobora que lo más probable es que no haya una relación directa entre la longevidad y esta inserción.
3. Uno de los principales motivos por los que esta hipótesis es rechazada, se debe a que los lugares donde aparecen las inserciones de las bases, coinciden con las zonas de hibridación de los primers, por lo que estos resultados pueden no ser fiables.
4. Para continuar este trabajo, sería apropiado realizar amplificaciones de un fragmento de mayor tamaño, y que dicho fragmento englobe las zonas conflictivas que se han hallado en este estudio. Para ello, habría que seleccionar cebadores que amplifiquen una cadena más larga para ratificar o rechazar con mayor firmeza la relación de SNPs en la FOXO3 con la longevidad de los animales.
5. Por último, esta investigación servirá como base para futuros ensayos, ya que hasta el momento, no existían en este modelo estudios similares al llevado a cabo en este TFG. El hecho de continuar con la investigación en cualquier ámbito que guarde relación con la ELA, supone una esperanza para los enfermos que padecen esta patología.

INGLÉS

1. In relation to the possibility that there are SNPs in the FOXO3 gene that may be related to the increase in the longevity of the mice, there is a very low probability that this hypothesis is true in the analyzed samples.
2. Although it was found that there was an insertion of C and A in the samples 5F, 6F, 11F and 12F, and that also it coincided with the longest-lived mice, this insertion was also found in the sample 9F, which did not belong to the group of very long-lived mice. This confirms that most likely there is not a direct relationship between longevity and this insertion.
3. One of the main reasons why this hypothesis is rejected, is because the places where the insertions of the bases appeared, coincided with the hybridization zones of the primers, so these results may not be reliable.
4. In order to continue with this research, it would be appropriate to carry out amplifications of a larger fragment, and that this fragment encompasses the conflictive zones that have been found in this study. Thus, it would be necessary to select primers

that amplify a longer chain to ratify or reject with greater firmness the relationship of the FOXO3 SNPs with the longevity of the animals.

5. Finally, this research will serve as a basis for future investigations, since until now, studies similar to the one carried out in this TFG do not exist in this murine model. The continuation of studies in any field related to ALS, offers a chance for people suffering this condition.

VALORACIÓN PERSONAL

A raíz de la oportunidad de poder llevar a cabo este trabajo, he adquirido conocimientos muy enriquecedores y valiosos sobre la Esclerosis Lateral Amiotrófica y todo lo que esta patología conlleva. Además, me ha resultado muy interesante el adquirir la cognición del modelo murino con el que se trabaja para poder estudiar este tipo de afecciones, ya que, anteriormente, nunca había practicado ninguna investigación con un modelo animal.

Asimismo, me he instruido y he asimilado técnicas de laboratorio fundamentales para el desarrollo de mi futuro laboral como investigadora tales como el genotipado, la PCR convencional, la electroforesis, y la purificación de muestras de ADN; todas ellas suponen un pilar fundamental en mi desenvolvura en próximas investigaciones de laboratorio.

También, me ha resultado muy valiosa la asimilación minuciosa del uso de webs tan imprescindibles en el desarrollo de mi carrera como *Pubmed*, *Primer-BLAST* y *Primer3*, cuya utilidad en profundidad no aprendí a lo largo de la carrera.

Por último, he logrado asimilar un pensamiento científico más amplio, y he adquirido habilidades para trabajar en equipo, tan necesarias como básicas para mi futuro laboral. Gracias a todos estos puntos, he avanzado como profesional de la medicina y la investigación mediante la tutorización de este trabajo de fin de grado.

AGRADECIMIENTOS

A la prof. Ana Cristina Calvo Royo y a Laura Moreno Martínez, por haberme dado la oportunidad y el honor de aportar mi granito de arena a este proyecto tan esperanzador e ilusionante.

A mi padre el Dr. Vicente Carreño García, mi ejemplo a seguir, por haberme inculcado desde pequeña su pasión por la medicina, por el esfuerzo y por el trabajo bien realizado, y por su dedicación en la revisión de esta pequeña investigación.

A la Dra. Inmaculada Castillo Aguilar, por compartir su conocimiento conmigo y tener la paciencia y el detalle de su ayuda en este trabajo.

A mi hermana gemela Carmen Carreño Gútiez, por escucharme cuando me desanimaba con errores informáticos con los que este trabajo no habría podido ser finalizado a tiempo, y por haberlos subsanado.

A mi pareja Víctor Alonso Morán, por acompañarme durante toda la carrera y apoyarme siempre.

A mi amigo Ivelin Danchev, por haberme del mismo modo arreglado problemas informáticos de este TFG, y por hacerme conocer y entender la esclerosis en primera persona. Por personas como él, merecen la pena este tipo de investigaciones.

Por último, a la Universidad de Zaragoza, por haberme formado tanto a nivel personal como profesional, para ejercer la medicina veterinaria de la manera más honesta y sobresaliente posible.

BIBLIOGRAFÍA

Azuaje, F. 2010. *Bioinformatics and Biomarker Discovery: «Omic» Data Analysis for Personalized Medicine*. West-Sussex, UK: Wiley-Blackwell.

Beghi, E., Chiò, A., Couratier, P., Esteban, J., Hardiman, O., Logrosino, G., *et al.* 2011. «The Epidemiology and Treatment of ALS: Focus on the Heterogeneity of the Disease and Critical Appraisal of Therapeutic Trials». *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 12 (1): 1-10. <https://doi.org/10.3109/17482968.2010.502940>.

Beghi, E., Mennini, T. 2004. «Basic and clinical research on amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders in Italy: recent findings and achievements from a network of laboratories». *Neurological Sciences* 25 (0): s41-60. <https://doi.org/10.1007/s10072-004-0228-1>.

Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock V., Loddenkemper C., M. Eilers, M., y Schmitt, C. A. 2007. «FoxO Transcription Factors Suppress Myc-Driven Lymphomagenesis via Direct Activation of Arf». *Genes & Development* 21 (21): 2775-87. <https://doi.org/10.1101/gad.453107>.

Brusilow, W. 2017. «Identification of the Isomer of Methionine Sulfoximine That Extends the Lifespan of the SOD1 G93A Mouse». *Neuroscience Letters* 647 (abril): 165-67. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.03.029>.

Calvo, A.C., Manzano, R., Atencia-Cibreiro, G., Oliván, S., Muñoz, M., Zaragoza, P., Cordero-Vázquez, P., Esteban-Pérez, J., García-Redondo, A., y Osta, R. 2012. «Genetic Biomarkers for ALS Disease in Transgenic SOD1G93A Mice». Editado por Mark R. Cookson. *PLoS ONE* 7 (3): e32632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032632>.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I., Boeve, B., Boxer, A., Baker, M., Rutherford, N., Nicholson, A., *et al.* 2011. «Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS». *Neuron* 72 (2): 245-56. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>.

Freepik. <https://www.freepik.es> (consultada el 15 de junio de 2019).

Funakoshi, H., Belluardo, N., Arenas, E., Yamamoto, Y., Casabona, A., Persson, H., e Ibanez, C. 1995. «Muscle-Derived Neurotrophin-4 as an Activity-Dependent Trophic Signal for Adult Motor Neurons». *Science* 268 (5216): 1495-99. <https://doi.org/10.1126/science.7770776>.

Genbank. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (consultada el 4 de abril de 2019).

- Grossi, V., Forte, G., Sanese, P., Peserico, A., Tezil, T., Lepore Signorile, M., Fasano, C., *et al.* 2018. «The Longevity SNP Rs2802292 Uncovered: HSF1 Activates Stress-Dependent Expression of FOXO3 through an Intronic Enhancer». *Nucleic Acids Research* 46 (11): 5587-5600. <https://doi.org/10.1093/nar/gky331>.
- Gurney, M., Pu, H., Chiu, A., Dal Canto, M., Polchow, C., Alexander, D., Caliendo, J., *et al.* 1994. «Motor Neuron Degeneration in Mice That Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation». *Science* 264 (5166): 1772-75. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>.
- Kaal, E. 1997. «Prevention of apoptotic motoneuron death in vitro by neurotrophins and muscle extract». *Neurochemistry International* 31 (2): 193-201. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(96\)00148-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(96)00148-9).
- Keller-Peck, C., Feng, G., Sanes, J., Yan, Q., Lichtman, J., y Snider, W., 2001. «Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Administration in Postnatal Life Results in Motor Unit Enlargement and Continuous Synaptic Remodeling at the Neuromuscular Junction». *The Journal of Neuroscience* 21 (16): 6136-46. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06136.2001>.
- Leigh N. 2013. «Motor Neuron Disease: Amyotrophic Lateral Sclerosis.» En , Neuroscience in the 21st Century. D.W. Pfaff., 2861-2902. Laboratory of Neurobiology and Behavior, the Rockefeller University, New York, NY, USA: Springer Science + Business Media, LLC.
- Mantilla, C., Zhan, W., y Sieck, G. 2004. «Neurotrophins Improve Neuromuscular Transmission in the Adult Rat Diaphragm». *Muscle & Nerve* 29 (3): 381-86. <https://doi.org/10.1002/mus.10558>.
- Miller, R., Mitchell, J., y Moore, D. 2012. «Riluzole for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)/Motor Neuron Disease (MND)». Editado por Cochrane Neuromuscular Group. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, marzo. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001447.pub3>.
- Morrice, J., Gregory-Evans, C., y Shaw, C. 2018. «Animal Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comparison of Model Validity». *Neural Regeneration Research* 13 (12): 2050. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.241445>.
- Primer-BLAST. Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (consultada el 5 de abril de 2019).
- Primer3. Howard Hughes Medical Institute, the National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute. <https://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi (consultada el 5 de abril de 2019).

Rando, A., Pastor, D., Viso-León, M., Martínez, A., Manzano, R., Navarro, X., Osta, R., y Martínez, S. 2018. «Intramuscular Transplantation of Bone Marrow Cells Prolongs the Lifespan of SOD1G93A Mice and Modulates Expression of Prognosis Biomarkers of the Disease». *Stem Cell Research & Therapy* 9 (1): 90. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0843-z>.

Renault, V., Thekkat, P., Hoang, K., White, J., Brady, C., Kenzelmann Broz, D., Venturelli, O., et al. 2011. «The Pro-Longevity Gene FoxO3 Is a Direct Target of the P53 Tumor Suppressor». *Oncogene* 30 (29): 3207-21. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.35>.

Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D. et al. 1993. «Mutations in Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis». *Nature* 362 (6415): 59-62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>.

Carreño, V., Castillo, I. 2001. *Principios de biología molecular*. 1.^a ed. Barcelona: Springer.